всех инокулированных КЭ произошла в течение 24-48 ч, и в РТГА данные изоляты взаимодействовали только со специфической сывороткой к вирусу гриппа А подтипа H5N1. По результатам определения IVPI данные изоляты охарактеризованы как высокопатогенные. Изучены клинические признаки и патолого-анатомические изменения при гриппе у цыплят, установлено острое течение болезни.

РЕЗЮМЕ

Проведено изучение биологических свойств изолятов вируса гриппа подтипа H5N1, выделенных на территории Российской Федерации в 2006 году. Вирус был изолирован на СПФ-куриных эмбрионах и типирован в РТГА. По результатам определения индексов патогенности изоляты признаны высокопатогенными. Изучены клинические признаки болезни и течение инфекции у цыплят.

SUMMARY

Biological characteristics of avian influenza A virus isolates, recovered in the Russian Federation territories in 2006, were studied. The virus was isolated in SPF chicken embryos and subtyped by hemagglutination inhibition test. The IVPI values demonstrated that isolates were highly pathogenic. Clinical signs and the disease course in chicks were studied.

Литература

1. Чвала, И.А. Биологические свойства изолята вируса гриппа птиц A/Duck/Novosibirsk/2/2005 H5N1 / И.А. Чвала, В.В. Дрыгин // Ветеринарная патология. 2006. № 4(19). С.60-63.
2. Alexander, D.J. Orthomyxovirus infections / D. J. Alexander // Virus Infections of Birds. Amsterdam etc., 1993. P. 287-316.
3. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls / V.S. Hinshaw, G.M. Air, A.J. Gibbs [et al.] // J. Virol. 1982. Vol. 42. P. 865–872.
4. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl / H. Chen, G.J. Smith, S.Y. Zhang [et al.] // Nature. 2005. Vol.436. P. 191-192.
5. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards / J. Keawcharoen, K. Oraveerakul, T. Kuiken [et al.] // Emerg. Inf. Dis. 2004. N 10. P. 2189–2191.
6. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster, W.J. Bean, O.T. Gorman [et al.] // Microbiol. Rev. 1992. Vol. 56. P. 152–179.
7. Feline friend or potential foe? / T. Kuiken, R. Fouchier, G. Rimmelzwaan [et al.] // Nature. 2006. N 440. P. 741–742.
8. Further Spread of Avian Influenza in Europe, Detection in French Farmed Birds and German Cat // Editorial Team, European communicable disease bulletin 2006. / www.eurosurveillance.org/ew/2006/060302.asp.
9. Global patterns of influenza A virus in wild birds/ B. Olsen, V.J. Munster, A. Wallensten [et al.] // Science. 2006. Vol. 31. P. 2384–2388.
10. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 2005. www.OIE.int.
11. Replication of avian influenza A viruses in mammals // V.S. Hinshaw, R.G. Webster, B.C. Easterday, W.J. Bean // Infect. Immun. 1981. Vol. 34. P. 354–361.
12. Subclinical infection with avian influenza A H5N1 virus in cats / M. Leschnik, J. Weikel, K. Mostl [et al.] // Emerg. Inf. Dis. Vol. 13 (ahead of print).
13. Swayne, D.E. Highly pathogenic avian influenza / D.E. Swayne, D.L. Suarez // Rev. Sci. Tech. 2000. Vol. 19. P. 463-468.
14. Vahlenkamp, T.W. Influenza virus infections in mammals / T.W. Vahlenkamp, T.C. Harder // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2006. Bd. 119. S. 123–131.

УДК 619:616.98:578.834.11:636.52/.58

О.А. Чупина, Е.В. Овчинникова, Л.О. Щербакова, Н.С. Мудрак, В.И. Диев, А.В. Борисов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПА И СТЕПЕНИ ПАТОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР

Введение

Инфекционный бронхит кур (ИБК) наносит существенный экономический ущерб промышленному птицеводству. Антигенная структура вируса ИБК чрезвычайно изменчива, что затрудняет вакцинопрофилактику данного заболевания [1]. Поэтому выделение, генетическая идентификация возбудителя, определение его биологических свойств и эпизоотической роли являются актуальной задачей. В ФГУ «ВНИИЗЖ» исследуются пробы патологического материала, которые поступают из птицехозяйств разных регионов России и ближнего зарубежья. На основании молекулярно-генетических и серологических методов установлено, что большинство выявляемых изолятов вируса ИБК относится к широко распространенному в России серотипу Массачусетс [3, 5, 7]. Однако за последний период времени на территории РФ стали выявляться изоляты вируса ИБК, генетически и антигенно отличающиеся от ранее встречав-

Таблица 1

Структура праймера для амплификации и секвенирования вариабельной области гена S1

Праймер	Последовательность 5/-3/	Длина	Позиция на геноме ИБК	Применение
S5(-)	GTG CCA TTG ACA AAA TAA GC	20	622-641	ПЦР секвенирование
S6(-)	ACA TC(T/A) TGT GCG GTG CCA TT	20	634-653	ПЦР
S7(+)	TAC TAC TAC CAG AGT GC(C/T) TT	20	82-101	ПЦР
S9(+)	GAT GGT TGG CAT TT(A/G) CA(C/T) GG	20	112-131	ПЦР секвенирование

(+) прямой праймер;
(-) обратный праймер;
нумерация соответствует штамму Н-120 (M21970)

шихся и близкие к изолятам, выделенным в Китае и Корее [2, 8, 9].

В 2007 г. на одной из птицефабрик Краснодарского края от заболевших с признаками поражения почек цыплят в возрасте 40-45 дней был отобран патматериал. Целью данной работы являлось подтверждение наличия в патматериале возбудителя ИБК, определение генотипа изолята и степени патогенности для естественно-восприимчивых животных.

Материалы и методы

Вируссодержащий материал (ВСМ) в виде суспензии почек цыплят и аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) после первого пассажа был получен из Краснодарской краевой ветеринарной лаборатории.

Выделение РНК из суспензии почек цыплят и аллантоисной жидкости проводили согласно инструкции по применению тест-системы GenePak для обнаружения РНК возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции компании «БИОКОМ».

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в программируемом амплификаторе «Терцик» (Россия), согласно методике Бочкова Ю.А. и соавторов [3]. Амплификация проведена с праймерами S6(-), S7(+) и состояла из 35 циклов со следующими параметрами: первоначальная денатурация ДНК при 93° С в течение 2 минут, 35 циклов, состоящих из трех этапов – денатурация ДНК – 20 сек. при 93° С; отжиг праймеров – 20 сек. при 50° С; элонгация цепи – 40 сек. при 72° С. При постановке «гнездовой» ПЦР проводили 25 циклов при тех же параметрах реакции с праймерами S5(-) и S9(+).

Секвенирование ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Для амплификации и секвенирования фрагмента гена S1 были использованы праймеры, указанные в табл. 1. Полученную нуклеотидную последовательность фрагмента гена S1 сравнивали с последовательностями штаммов вируса инфекционного бронхита кур, полученными из международной базы данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Сравнительный анализ последовательностей проводили с помощью программы BioEdit версия 7.0.5.3. (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Пассирование вируса ИБК проводили введением ВСМ в аллантоисную полость СПФ РКЭ по общепринятой методике [3]. Исключение контаминации исходного материала вирусом инфекционной бурсальной болезни и инфекционного ларинготрахеита проводили в ПЦР, вирусом ньюкаслской болезни – в ПЦР и реакции гемагглютинации.

Титрование вируса ИБК в трахеальной органной культуре (ТОК). Переживающие эксплантаты готовили из трахей 19-21-суточных СПФ РКЭ, используя для поддержания среду ПСП с антибиотиками [4], и культивировали на 24-луночных полистироловых плашках в инкубаторе с 5% CO_2 при температуре 37° С. В лунки вносили по 1 мл разведений от 10^{-1} до 10^{-5} вирусной суспензии на поддерживающей среде. Наличие или отсутствие цилиостаза учитывали в течение 10 суток после заражения. Титр вируса определяли в дозах, вызывающих цилиостаз в половине культур (CD_{50}), по методу Рида и Менча. Цилиостаз в ТОК, наступивший ранее 48 ч после заражения, считали неспецифическим.

Биопробу проводили на 19 цыплятах 11-суточного возраста, 15-ти из которых вводили ВСМ в виде аллантоисной жидкости КЭ 4 пассажа, а 4 служили в качестве контроля. Заражение птиц проводили различными методами: по 60 мкл интраназально, по 100 мкл перорально и интратрахеально, по 1 капле – на конъюнктиву глаз (общее количество вируса ИБК для одно-

Таблица 2

Генетическое родство изолята IBV663-07 с известными вариантами вируса ИБК

Название и регистрационный номер варианта вируса	Регион обнаружения	Уровень гомологии, %
IBV663-07	Россия, Краснодарский край	100
Korea-K3-3 S1	Южная Корея	97,92
FR/L-145OT/05	Франция	97,33
QXIBV, JX 99 01	Китай	97,03
Holland/L-1449K/04	Голландия	97,0
IBV 15-06	Россия, Краснодарский край	95,55
IBV 05-06	Россия, Амурская обл.	93,47
IBV 10-06	Россия, Волгоградская обл.	91,4
Вакцинные штаммы		
UK 4/91		75,55
Mass41		75,37
Connect		75,07
D274		75,07

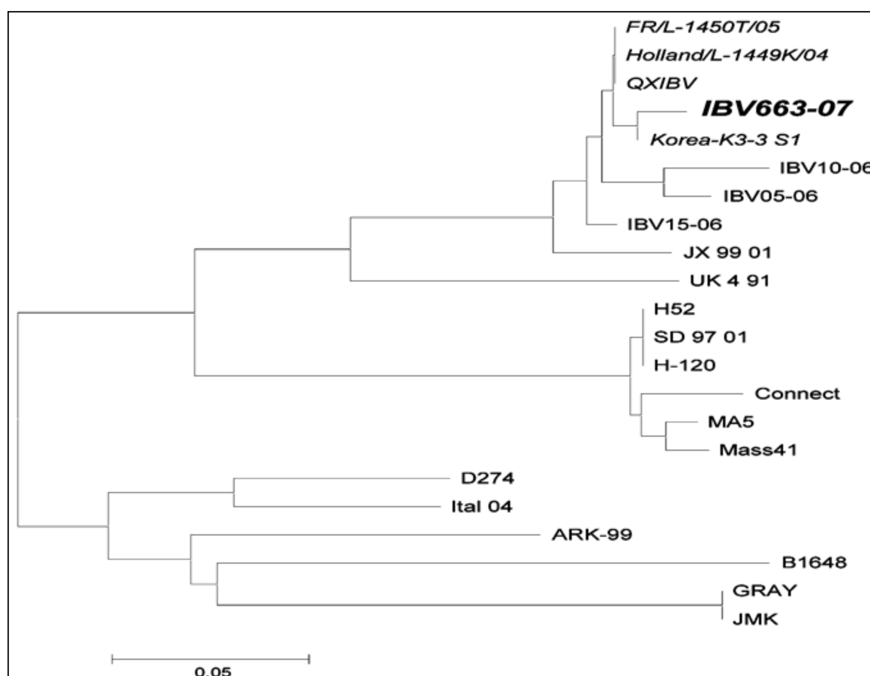


Рис. 1. Дендрограмма, отражающая процент нуклеотидных различий фрагмента гена S1 вируса ИБК

го цыпленка составляло 300 CD_{50} в объеме 300 мкл). Через 7 и 40 суток после заражения по 2 цыпленка из опытной группы были убиты и вскрыты.

Получение специфических сывороток. Через 30 суток после введения вируса цыплятам опытной группы вводили внутримышечно в область бедра инактивированный димером вирус в смеси с полным адъювантом Фрейнда в объеме 0,5 мл. Титры антител к вирусу ИБК в сыворотках крови цыплят определяли в ИФА на 7, 14, 21, 28 и 62 сут. после начала опыта.

Результаты и обсуждение

Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена S1 показал, что выделенный в Краснодарском крае изолят вируса ИБК имеет более 97% гомологии с изолятами, выделенными в странах Азии и в Европе, некоторое генетическое родство с изолятами, выделенными в России, и низкую степень гомологии с вакцинными штаммами, используемыми для профилактики ИБК в России (табл. 2).

Генетическое родство изолятов вируса ИБК по фрагменту гена S1 представлено на рис. 1.

Таким образом, изолят IBV663-07, выделенный в Краснодарском крае, является генетически родственным изолятам, выделенным в Южной Корее (Korea-K3-3), Франции (FR/L-145OT/05) и Китае (QXI-

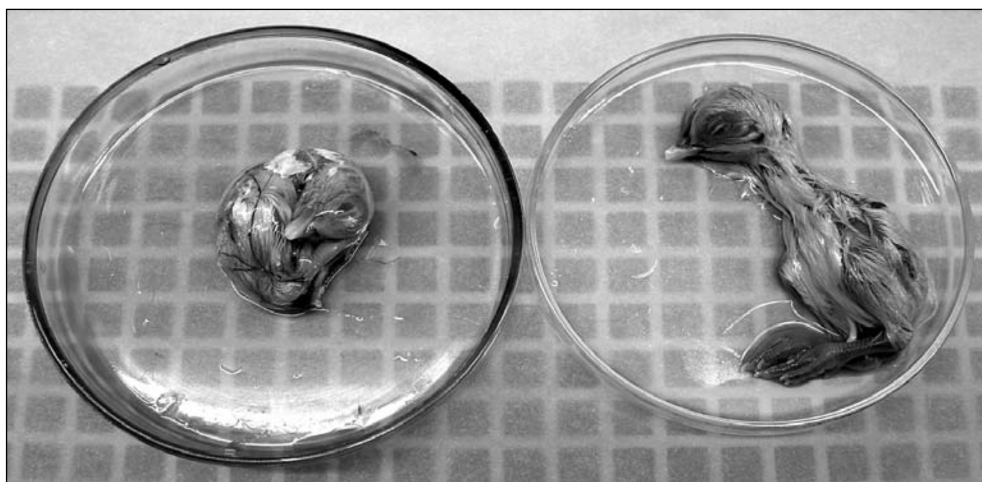


Рис. 2. Эмбриопатическое действие изолята IBV663-07 вируса ИБК (слева – эмбрион через 10 сут. после заражения, справа – контроль)

BV, JX 99 01), поскольку нуклеотидная гомология исследуемого фрагмента гена S1 с этими изолятами составила 97,92%, 97,33 % и 97,03%, соответственно. Вирусы, генетически сходные с указанными изолятами, в последние годы обнаруживаются в России. Так, появление в Амурской области изолятов вируса ИБК, генетически родственных с изолятами QXIBV и TJ-99-01, может объясняться географической близостью с Китаем. Еще одно предположение может объяснить выявление изолятов, относящихся к китайской генетической группе, на птицефабриках Центральной России. В течение длительного времени считалось, что вирус ИБК поражает только птиц семейства куриных. Вирус способен инфицировать домашних кур (Gallus gallus) и редко выделяется от индюков и фазанов [1]. Однако недавно вирус ИБК был выделен от других видов птиц в Китае, включая павлинов, цесарок, куропаток и, что более интересно, от чирка, принадлежащего к семейству утиных. Конечно, следует отметить, что эти птицы контактировали с домашними курами и содержались вблизи от них. Таким образом, способность вируса ИБК реплицироваться, хотя и асимптоматично, в организме утки, относящейся к отряду гусинообразных, где многие виды являются перелетными птицами, может потенциально привести к переносу вируса на большие расстояния. Эта гипотеза, высказанная Cavanagh (2002), может служить объяснением случаев выявления одного и того же генотипа вируса ИБК (например, QX-IBV) в географически удаленных регионах [6]. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие исследования.

Для проведения иммунологических исследований необходимо, чтобы изучаемый вирус обладал способностью накапливаться в тест-системе в высокой концентрации. Для адаптации вируса к КЭ проведено 6 пассажей в РКЭ. При этом вирус не приобрел летальных свойств по отношению к КЭ, однако обладал характерным для вируса ИБК эмбриопатическим действием, которое начали отмечать в 5 пассаже на 11 сутки после заражения эмбрионов и которое проявлялось в карликовости, скручивании эмбриона, сморщивании желточного мешка и увеличении количества аллантоисной жидкости (рис. 2).

Известно, что заболевание, которое может вызывать вирус ИБК, отличается многообразием клинических проявлений, что может зависеть от особенностей возбудителя, возраста и иммунного статуса инфицированных птиц, условий их содержания и т. д. Однако при попадании в организм восприимчивого животного вирус ИБК первично реплицируется в клетках ресничного (цилиарного) эпителия дыхательного тракта, вызывая их гибель и нарушение функции ткани [1]. Поэтому одним из эффективных методов детекции вируса ИБК является внесение ВСМ в органную культуру трахеи КЭ. Полевые изоляты вируса ИБК реплицируются в данной культуральной системе без предварительной адаптации к ней, что вызывает поражение ресничного эпителия трахеальных эксплантатов [4]. В наших опытах по изу-

чению свойств изолята в ТОК на третьи сутки инкубации отмечали набухание подслизистого слоя, сужение просвета трахеи, снижение активности цилиарного движения. Цилиостаз в культурах наступал через 72-96 ч после заражения, что является обычными сроками для большинства изолятов ИБК [10].

При этом титр инфекционной активности вируса в экстраэмбриональной жидкости в течение 5 пассажей, определявшийся в ТОК, не превышал 3,0 lg CD_{50}/мл. По данным ряда исследователей (1, 10), для адаптации вируса к РКЭ и получения высоких титров вируса в них в некоторых случаях требуются десятки пассажей. Проведенные исследования по адаптации вируса к КЭ являются предварительными и пока не позволяют провести серологическое исследование с использованием эмбрионов кур.

При проведении биопробы фиксировали угнетение, ринит, трахеальные хрипы, которые проявились у инфицированных цыплят на 4 сутки после заражения. Наиболее выраженным респираторное расстройство было на 6-7 сутки после начала опыта, которое исчезало к 14 суткам. При вскрытии 2 цыплят, подвергнутых диагностическому убою через 7 суток после инфицирования, выявлены увеличение и мозаичное окрашивание почек, отложение уратов в мочеточниках. У одного цыпленка обнаружены фибринозный экссудат в трахее, отек и серозно-фибринозные отложения в легких. Методом ПЦР исследуемый изолят вируса ИБК был обнаружен в трахеях убитых цыплят. В почках и общей пробе (трахея, легкие, почки, миндалины кишечника) геном вируса обнаружен не был. Через 10 недель после заражения при вскрытии цыплят установлено наличие выраженных нефрозо-нефритов.

При исследовании в ИФА сывороток крови от инфицированных цыплят наличие титров антител к ИБК отмечали через 10 суток после заражения, когда средний титр антител в крови иммунизированной птицы составлял 1:856. После инокуляции цыплятам концентрированного препарата титры антител повышались и через 21 сутки после инъекции достигли среднего значения 1:1499. Через 10 недель после начала опыта все цыплята были обескровлены, от них была получена специфическая сыворотка, которая будет использована для дальнейших диагностических исследований.

Выводы

1. Изолят IBV663-07 вируса ИБК, выделенный в Краснодарском крае, по результатам нуклеотидного секвенирования фрагмента гена S1 гомологичен изолятам, выделенным в Южной Корее, Франции и Китае. Представители этой группы изолятов в последнее время регистрируются на территории РФ.

2. Через 6 пассажей в РКЭ вирус вызывает характерное для ИБК эмбриопатическое действие. В ТОК изолят также вызывает разрушение цилиарного эпителия и цилиостаз в течение 72-96 ч. Накопление вируса в РКЭ не превышает 3,0 lg CD_{50}/мл.

3. При заражении 11-суточных цыплят исследуемый изолят вызывает респираторные расстройства, проходящие к 14 дню после инфицирования, и нефрозонефрит.

4. Поскольку изолят IBV663-07 вируса ИБК вызывает у кур редко встречающийся в России нефротический синдром, относится к новой для нашей страны генетической группе, необходимо проводить дальнейшую адаптацию его к РКЭ и изучение иммунобиологических свойств вируса для возможного использования его для приготовления вакцин.

РЕЗЮМЕ

Проведены исследования нового изолята вируса инфекционного бронхита кур IBV663-07, выделенного в Краснодарском крае в 2007 г. По результатам нуклеотидного секвенирования фрагмента гена S1 изолят IBV663-07 родственен вирусам инфекционного бронхита кур, зарегистрированным в Южной Корее, Франции и Китае. Через 6 пассажей в развивающихся куриных эмбрионах наблюдали их карликовость и скрученность. При внесении в трахеальную органную культуру вирус вызывал разрушение эпителия и цилиостаз через 72-96 ч после заражения, титр вируса составил 3,0 lg CD50/мл. При заражении цыплят исследуемый вирус вызывал респираторные нарушения и нефрозо-нефрит.

SUMMARY

A new isolate IBV663-07 of chicken infectious bronchitis virus, isolated in the Krasnodarsky Krai in 2007, was studied. The results of nucleotide sequencing of the gene S1 fragment showed that the isolate IBV663-07 was related to chicken infectious bronchitis viruses reported from South Korea, France and China. In 6 passages in chicken embryonated eggs their stunting and twisting were observed. Following introduction into tracheal organ culture the virus caused epithelium destruction and ciliastasis in 72-96 hours after infection, the virus titre was 3.0 lg CD50/ml. The tested virus caused respiratory disorders and nephrotic syndrome.

Литература

1. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина М.: ВНИТИБП, 1998. С. 672–683.
2. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России / Е. В. Овчинникова, Ю. А. Бочков, Г. В. Батченко [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. Т. 5. Владимир, 2007. С. 303-317.
3. Изучение спектра полевых изолятов вируса инфекционного бронхита кур в России с использованием молекулярно-биологических и серологических методов / А.В. Борисов, Ю.А. Бочков, С.В. Фролов [и др.] // Птицеводство – мировой и отечественный опыт: матер. конф. М., 2002. С. 23-24.
4. Условия получения трахеальной органной культуры куриных эмбрионов для выделения и типирования вируса инфекционного бронхита кур / О. А. Чупина, С. В. Фролов, В. И. Диев [и др.] // Сибирская язва и др. опасные инфекц. болезни жив-х: матер. по теме работы круглого стола, приуроченного к 80-летию академика РАСХН Бакулова И. А. Покров, 2005. С. 225-227.
5. Филогенетический анализ изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России / Ю.А. Бочков, А.В. Борисов, Л.О. Щербакова [и др.] // Аграрная Россия. 2002. №2. С. 11-16.
6. Coronaviruses from pheasants (Phasianus colchicus) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys / Cavanagh D., Mawditt K., Welchman D. de V.[et al.] // Avian Pathol. 2002. Vol. 31, № 1. P. 81-95.
7. Differentiation of avian infectious bronchitis virus field isolates in Russia using molecular-biological and serological methods / Y. Botchkov, A. Borisov, V. Irza [et al.] // 11th European Poultry Conference: Bremen, Germany. 6-10 Sept. Bremen, Germany, 2002. P. 176.
8. Lee, C.W. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene / C.W. Lee, D.A. Hilt, M.W. Jackwood // J. Vet. Diagn. Invest. 2003. Vol.15, N 4. P.344-348.
9. Liu, S. New genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and nonvaccinated flocks in China / S. Liu, X. Kong // Avian Pathol. 2004. Vol.33, N 3. P. 321–327.
10. Mondal, S.P. Isolation and characterization of a novel antigenic subtype of infectious bronchitis virus serotype DE 072 / S.P. Mondal, B. Lucio-Martinez, S.A. Nagi // Avian Dis. 2001. Vol. 45, N 4. P. 1054–1059.

УДК 619:616.98:587.832.1:598.2:573.6.086.83:57.083.3

М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, Е.В. Белик

РАЗРАБОТКА КОНКУРЕНТНОГО ВАРИАНТА ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА ПОДТИПА Н5 У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПТИЦ

Введение

Грипп птиц (ГП) – острая контагиозная вирусная инфекция домашних и диких птиц, характеризующаяся общим угнетением, отеками, множественными кровоизлияниями и поражениями внутренних органов, мозга и кожи. Вирусы гриппа имеют сегментированную одиночную отрицательно закрученную цепочку РНК и относятся к семейству *Orthomyxoviridae*. Вирусы гриппа типа А разделены на подтипы, основанные на антигенном родстве поверхностных гликопротеинов, гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). В настоящее время существует 16 НА подтипов (Н1-Н16) и девять подтипов NA (N1-N9). До настоящего времени только вирусы подтипов Н5 и Н7 вызывали высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) у восприимчивых видов [6].

За последние 10 лет не только увеличилось количество вспышек ВПГП, но и число вовлеченных птиц, а также материальные затраты на борьбу с заболеванием. Кроме того, беспрецедентное появление и распространение высокопатогенного вируса ГП H5N1 в России и за ее пределами выдвинуло ГП на первое место среди опасных болезней животных [6].

Существует несколько методов для выявления подтипоспецифических антител к вирусу ГП. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) является «золотым стандартом» при диагностике гриппа, но при исследовании сывороток крови уток и некоторых других видов птиц антитела могут не выявляться из-за действия неспецифических ингибиторов, для устранения которых сыворотки необходимо подвергать обработке, снижающей уровень специфических антител [1]. Наиболее достоверные результаты по титро-